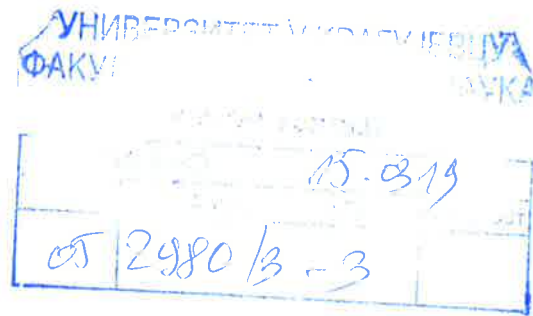


УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАУЧНО-НАСТАВНОМ ВЕЋУ



1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-15/61 од 22.01.2019. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Драгане Ђорђевић, под називом: „**Антиинфламацијска активност смеше дипропил полисулфида у експерименталном моделу акутног хепатитиса**“.

Чланови Комисије су:

1. Проф. др Вера Дондур, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физичка хемија, председник;
2. Проф. др Драган Манојловић, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Аналитичка хемија, члан;
3. Проф. др Владислав Воларевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

На основу увида у приложену документацију, комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу:

2. Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Интегрисане академске студије Фармације, универзитета у Крагујевцу уписала 2009/2010. Успешно завршила 2013/2014 године са просечном оценом 8,69. Школске 2014/2015

уписала Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација. Положила усмени докторски испит, оцена 9. Од 2016. године обавља посао сарадника у настави на предмету Основи физичке хемије. Активно учествује у извођењу експеримената у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија на Факултету медицинских наука у Крагујевцу.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов:

„Антиинфламацијска активност смеше дипропил полисулфида у експерименталном моделу акутног хепатитиса“

Предмет:

Испитивање антиинфламацијског и хепатопротективног ефекта новосинтетисане смеше дипропил полисулфида *in vivo* у моделу акутног хепатитиса изазваног конканавалином А (енгл. *Concanavalin A*, ConA).

Хипотеза:

Дипропил полисулфиди делују антиинфламацијски и хепатопротективно и смањују оштећење јетре изазвано конканавалином А.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио рад у целини у часопису М51 категорије у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву теме докторске дисертације:

1. **Djordjevic D**, Milovanovic J, Jurisevic M, Stojanovic B, Cvetkovic O, Pergal M, Ristanovic E, Vojvodic D, Simić M, Manojlovic D, Milovanovic M, Arsenijevic N. Anti-tumor effect of n-propyl polysulfides mixture *in vitro*. *Ser J Exp Clin Res* 2017; doi: 10.1515/SJECR-2017-0069. **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Конканавалин А је лектин изолован из биљке *Canavalia brasiliensis*. Tiegs и сарадници су 1992. године описали експериментални модел акутног инфламацијског оштећења јетре изазваног конканавалином А, који се преко рецептора за инсулин селективно депонује у

јетри. У патогенези СопА хепатитиса главну улогу играју Т лимфоцити а саму болест карактерише развој значајне инфламације, некроза ткива јетре праћена повећањем концентрације трансаминаза у серуму и често терминална инсуфицијенција. Овај модел болести има одређене карактеристике имунски посредованих болести јетре код људи, укључујући аутоимунски хепатитис.

Биљке рода *Allium*, којима припада бели лук, користе се у исхрани, народној медицини и фитотерапији. Већина њихових биолошких ефеката приписује се органосумпорним једињењима, која настају када се ткиво ових биљака оштети, сецкањем или жвакањем. Органосумпорна једињења имају широк спектар биолошких активности: антимикробна, антиканцерска, антиоксидантна, кардиопротективна, антиагрегациона. У белом луку преовладавају алил моно-, ди-, три- и тетрасулфиди док су у малим концентрацијама присутни и њихови засићени деривати, пропил сулфиди, о чијим биолошким ефектима има веома мало података.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај студије:

Потенцијални терапијски ефекти дипропил полисулфида до сада нису испитани *in vivo* у експерименталним моделима болести. Овим испитивањем би истражили антиинфламацијски и хепатопротективни ефекат новосинтетисаних дипропил полисулфида и евентуално указали на нове терапијске мере у превенцији и лечењу фулминантног хепатитиса.

Циљ студије:

Основни циљ истраживања је испитивање антиинфламацијске и хепатопротективне улоге смеше дипропил полисулфида у моделу акутног хепатитиса изазваног конканавалином А.

У складу са основним циљем постављени су и следећи **експериментални задаци**:

1. Процењом хистолошких и серумских параметара утврдити утицај смеше дипропил полисулфида на тежину хепатитиса изазваног конканавалином А.

2. Испитати разлике у саставу моноклеарних инфилтрата у јетри мишева који су пре апликације ConA примили једну оралну дозу смеше дипропил полисулфида и мишева којима је само апликован ConA.
3. Испитати разлике у експресији ензима који учествују у фагоцитози и ензима који делују хепатопротективно у јетри мишева који су пре апликације ConA примили једну оралну дозу смеше дипропил полисулфида и мишева којима је само апликован ConA.
4. Испитати разлике у активацији ендотела јетре мишева који су пре апликације ConA примили једну оралну дозу смеше дипропил полисулфида и мишева којима је апликован само ConA.
5. Упоредити профиле цитокина у серуму и доминирајући тип имунског одговора у ткиву јетре мишева који су пре апликације ConA примили смешу дипропил полисулфида и мишева којима је апликован само ConA.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Антиинфламацијски ефекти различитих органосумпорних једињења, међу њима и пропил дисулфида, су показани у културама макрофага стимулираних липополисахародом. Ова једињења инактивишу транскрипциони фактор NF- κ B и тако инхибирају продукцију проинфламацијских цитокина, IL-1 β , TNF- α , IL-6. У експерименталним моделима неалкохолне и алкохолне болести јетре је показано да органосумпорна једињења имају хепатопротективни ефекат. Антиоксиданту активност органосумпорна једињења остварују повећавајући експресију ензима II фазе у јетри, UDP-глукуронил трансферазе, глутатион S-трансферазе и хинон редуктазе. Осим тога ова једињења инхибирају и ензимску активност цитохрома P450.

Како је већи број атома сумпора у органосумпорним једињењима удружен са значајно већом антимикробном, антиоксидативном и антитуморском активношћу, у овој студији ће се испитивати антиинфламацијски ефекти смеше дипропил полисулфида, који у својој структури имају од 2 до 14 атома сумпора, у моделу акутног хепатитиса изазваног конканавалином А.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије:

Истраживање је осмишљено као експериментална студија на животињама *in vivo* као и *ex vivo* на ћелијама изолованим из експерименталних животиња.

2.7.2. Експерименталне животиње:

Истраживање ће се обавити на мужјацима соја C57BL/6 старим 8 недеља, виваријума Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

2.7.3. Узорковање:

Животиње ће методом случајног избора бити распоређене у кавезе и тако ће се формирати следеће експерименталне и контроле групе:

1. Група C57BL/6 мишева који орално примају смешу дипропил полисулфида и којима се након 6 сати интравенски апликује ConA
2. Група C57BL/6 мишева којима се интравенски апликује ConA
3. Група C57BL/6 мишева који орално примају смешу дипропил полисулфида и након 6 сати интравенски физиолошки раствор
4. Група C57BL/6 мишева којима се интравенски апликује физиолошки раствор

2.7.4. Варијабле које се мере у студији:

Независна варијабла: орална примена смеше дипропил полисулфида

Зависне варијабле: проценат некротичног ткива, концентрације трансаминаза у серуму, концентрације цитокина, проценат апоптоличних ћелија, активност каспазе 3 и лактат дехидрогеназе, проценти активираних и инфламацијских макрофага и ниво експресије Icam-1, Cxcl-10, Nox2, p22^{phox}, p47^{phox} и p65^{phox} у ткиву јетре.

Индуковање хепатитиса, примена смеше дипропил полисулфида и евалуација болести. Фулминантни облик хепатитиса ће се изазвати интравенском применом ConA у дози 12 mg/kg ТТ, претходно раствореног у физиолошком раствору у укупној запремини 200 µL. Смешу дипропил полисулфида мишеви ће примити орално у једној дози 20 mg. За

процену степена оштећења јетре радиће се биохемијске и хистопатолошке анализе. У серуму испитиваних животиња ELISA методом ће се мерити концентрације ензима AST и ALT (2, 4, 6, 8 и 24 сата после примене ConA). За хистопатолошку анализу јетре користиће се исечци добијени 24 сата после примене ConA обојени хематоксилином и еозином. Процент некротичних хепатоцита ће се одредити семиквантитативном методом, као што је раније описано.

Мерење цитокина у серуму и у хомогенатима јетре. Концентрације цитокина ће се мерити употребом сетова за мишје IL-1, IL-12, IL-4, IL-6, IL-17, IL-10, TNF- α и IFN- γ (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) према упутствима произвођача.

Изоловање инфилтришућих мононуклеарних ћелија јетре и проточна цитометрија. Ћелије ће бити издвојене из ткива јетре као што је то раније описано. Мононуклеарне ћелије ће бити регистроване помоћу моноклонских антитела (обележених флуоресцентним бојама) и то за: CD4, CD8 α , TCR β , F4/80, CD11b, CD11c, I-A/I-E, CD86, CD3, CD49b (BD Biosciences). За интрацелуларна бојења антителима за IL-1, IL-4, IL-6, IL-12, TNF- α , IL-10, IL-17 и IFN- γ , ћелије ће претходно бити активисане PMA/јономицином. Обележене ћелије ће бити анализирани помоћу FACSCalibur проточног цитометра (BD Biosciences), а анализа обављена коришћењем програма FlowJo (Tree Star).

Анализа апоптозе и некрозе хепатоцита. Парафински исечци јетре добијени 6 сати после примене ConA ће се бојити TUNEL методом и одређиваће се проценат апоптотичних хепатоцита. Активност каспазе 3 и лактат дехидрогеназе у хомогенату јетре ће се одредити коришћењем стандардног колориметријског кита.

Анализа експресије гена RT PCR методом. Из јетри мишева третираних испитиваном смешом и конканавалином А, изоловаће се RNA и методом RT PCR ће се анализирати експресија гена који кодирају: про- и анти- инфламацијске цитокине, NADPH-оксидазе (Nox2, p22^{phox}, p47^{phox} и p65^{phox}) као и ензиме који могу да делују хепатопротективно (Sod1, Sod2, Sod3, Ho-1).

Испитивање утицаја смеше дипропил полисулфида на функцију ендотела јетре. Из ткива јетре третираних мишева ће се издвојити RNA и RT PCR методом ће се анализирати експресија Icam-1 и Cxcl-10.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Величина узорка је израчуната на основу података о процентима макрофага у инфилтратима јетре добијеним у прелиминарном експерименту. Студијски узорак је израчунат узимајући вредност за алфа 0,05 и за снагу студије 0,8 за *Student*-ов *t* тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G*Power3. На основу претпоставке која захтева највећи узорак, односно очекиване најмање разлике у испитиваним параметрима између експерименталних и контролних група, утврђен је број експерименталних животиња према групама и он износи 25 за сваку од група, укупно 100. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (*Student*-ов *t* тест за два независна узорка) између две групе испитаника, са снагом студије $\geq 80\%$.

2.7.6. Статистичка обрада података

Добијени резултати ће бити представљени као средње вредности \pm стандардне девијације (или стандардне грешке). Статистичка значајност ће се одређивати *Student*-овим *t* тестом, а по потреби и *Mann-Whitney*-евим *U* test. Статистичка значајност ће бити претпостављена за $p=0,05$. Све статистичке анализе ће бити обављене употребом програма SPSS 18,0.

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да примена смеше дипропил полисулфида у експерименталном моделу хепатитиса изазваног конканавалином А има протективни ефекат, смањује некрозу хепатоцита и биохемијске параметре оштећења јетре.

Познато је да дипропил дисулфид у култури макрофага стимулираних LPS-ом инхибира NF- κ B и тако делује антиинфламацијски, па се очекује слабија активација макрофага и ендотела крвних судова јетре мишева који су примили испитивану супстанцу пре индукције хепатитиса, смањење инфламације у јетри и последично мање оштећење хепатоцита. Очекује се и да дипропил полисулфиди утичу на повећање експресије ензима који својом активношћу могу да делују хепатопротективно.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Биолошки активни принципи белог лука (*Allium sativum*) су органосумпорна једињења, алил- и пропил- сулфиди. Број атома сумпора у структури ових једињења позитивно корелира са јачином њиховог биолошког дејства. Новије студије показују да органосумпорна једињења имају антиинфламацијске и антиоксидативне ефекте. У овој студији ће се *in vivo* испитивати антиинфламацијски ефекти новосинтетисане смеше дипропил полисулфида у моделу акутног хепатитиса изазваног конканавалином А (енгл. *Concanavalin A*, ConA). Овако изазван хепатитис мишева је познат модел за испитивање аутоимунског хепатитиса људи.

Користиће се мишеви соја C57BL/6 подељени у четири групе (25 мишева по групи, укупно 100). Експериментална група мишева примиће оралну дозу (20 mg) смеше дипропил полисулфида, а након шест сати интравенску инјекцију ConA (12 mg/kg телесне тежине). Контролне групе ће примити само смешу дипропил полисулфида или ConA или физиолошки раствор респективно. Процена степена оштећења јетре утврдиће се мерењем концентрација аспартат- и аланин- аминотрансаминаза (AST, ALT) у серуму као и хистопатолошком анализом јетре. Одређиваће се концентрације цитокина у серуму и ткиву јетре а анализираће се функционални фенотип мононуклеарних ћелија у инфилтратима јетре. На основу активности каспазе 3 и лактат дехидрогеназе, анализираће се апоптоза и некроза хепатоцита. Анализираће се и утицај смеше дипропил полисулфида на функцију макрофага и ендотелних ћелија јетре као и на експресију гена за антиоксидантне ензиме.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације Комисија предлаже проф. др Марију Миловановић, ванредног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија. Предложени наставник испуњава услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

Проф. др Марија Миловановић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и планираном методологијом.

1. Volarevic V, **Milovanovic M**, Ljubic B, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, Leffler H, Lukic ML. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology*. 2012;55(6):1954-64.
2. Arsenijevic A, **Milovanovic M**, Milovanovic J, Stojanovic B, Zdravkovic N, Leung PS, Liu FT, Gershwin ME, Lukic ML. Deletion of Galectin-3 Enhances Xenobiotic Induced Murine Primary Biliary Cholangitis by Facilitating Apoptosis of BECs and Release of Autoantigens. *Sci Rep*. 2016;6:23348.
3. Volarevic V, Misirkic M, Vucicevic L, Paunovic V, Simovic Markovic B, Stojanovic M, **Milovanovic M**, Jakovljevic V, Micic D, Arsenijevic N, Trajkovic V, Lukic ML. Metformin aggravates immune-mediated liver injury in mice. *Arch Toxicol*. 2015;89(3):437-50.
4. Volarevic V, Mitrovic M, **Milovanovic M**, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, Pejnovic N, Arsenijevic N, Lukic ML. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *J Hepatol*. 2012;56(1):26-33.
5. Jurisevic M, Arsenijevic A, Pantic J, Gajovic N, Milovanovic J, **Milovanovic M**, Poljarevic J, Tibor S, Vojvodic D, Radosavljevic GD, Arsenijevic N. The organic ester O,O' - diethyl - (S,S) - ethylenediamine - N,N' - di - 2 - (3 - cyclohexyl) propanoate dihydrochloride attenuates murine breast cancer growth and metastasis. *Oncotarget* 2018; 9(46): 28195-28212.
6. **Milovanovic M**, Volarevic V, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pejnovic N, Arsenijevic N, Lukic ML. IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunol Res*. 2012 Apr;52(1-2):89-99.

Учешће на пројектима које финансира Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (ЈП102/15 и ЈП06/12)

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: имунологија, инфекција и инфламација.

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Вера Дондур**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физичка хемија, председник;
2. **Проф. др Драган Манојловић**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Аналитичка хемија, члан;
3. **Проф. др Владислав Воларевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

ЗАКЉУЧАК И ОДЛУКА КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег успеха на докторским студијама и публикованих радова Драгана Ђорђевић испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је прецизна и јасна. Комисија сматра да ће предложена докторска дисертација кандидата Драгане Ђорђевић бити од великог научног и практичног значаја, јер ће добијеним резултатима дати значајан допринос лечењу фулминантног хепатитиса.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Драгане Ђорђевић под називом **„Антиинфламацијска активност смеше дипропил полисулфида у експерименталном моделу акутног хепатитиса“**.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

V. Donduc

проф. др Вера Дондур, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физичка хемија, председник

D. Manojlović

проф. др Драган Манојловић, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Аналитичка хемија, члан

V. Volarević

проф. др Владислав Воларевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

У Крагујевцу, дана _____